

УДК 595.122

**ТОНКОЕ СТРОЕНИЕ ПОКРОВОВ ЦЕРКАРИЙ  
И РАЗВИВАЮЩИХСЯ МЕТАЦЕРКАРИЙ  
DIPLOSTOMUM CHROMATOPHORUM (TREMATODA: DIPLOSTOMIDAE)**

© И. М. Подвязная

Изучена ультраструктурная организация покровов зрелых церкарий и развивающихся метацеркарий *D. chromatophorum* от первого дня их развития во II промежуточном хозяине до достижения инвазионного состояния. Выявлены три четко выраженные стадии формирования покровов, по срокам коррелирующие с первыми тремя этапами развития метацеркарий *D. chromatophorum*, описанными Шигиным (1986). Показано, что весь спектр сменяющихся физиологических состояний в ходе развития метацеркарий *D. chromatophorum*, как и детали динамики паразито-хозяинных отношений, находят отражение в преобразованиях структуры покровов.

Среди многочисленных публикаций, посвященных тонкому строению покровов трематод, лишь в единичных работах рассмотрены морфофункциональные преобразования тегумента в ходе активно протекающих морфогенетических процессов (Popiel, 1976; Higgins, 1980; Galaktionov e. a., 1996, и др.). Вместе с тем исследования такого рода представляют несомненный интерес, поскольку именно в процессе развития наиболее наглядно проявляются важнейшие свойства данной системы — ее полифункциональность и пластичность, максимально реализуются ее широкие адаптивные возможности. Ниже приводятся данные о строении покровов у зрелых церкарий и развивающихся метацеркарий *Diplostomum chromatophorum*<sup>1</sup> от первого дня развития во втором промежуточном хозяине до достижения ими инвазионного состояния.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Зрелые церкарии *D. chromatophorum* собраны от природно инвазированных моллюсков *Lymnaea stagnalis*, любезно предоставленных нам А. А. Шигиным. Метацеркарии разных возрастов получены в результате экспериментального заражения церкариями искусственно выращенных сеголетков карпа. Рыбок, содержащихся в аквариуме при температуре 18—20°, вскрывали на 1, 3, 5, 6, 7, 10, 12, 20, 30, 34, 40 и 49-е сутки после заражения. Извлеченных из хрусталика глаза метацеркарий фиксировали, как и церкарий, 5 %-ным раствором глутаральдегида на 0.05 М какодильном буфере 3—5 ч на холоде с последующей постфиксацией 1 %-ным водным раствором  $\text{OsO}_4$  в течение 1 ч на холоде. Обезвоживание проводилось в спиртах возрастающей крепости и ацетоне, для заливки использовали аралдит. Тонкие срезы получали на ультратоме LKB—III, контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата и цитратом свинца по Рейнольдсу и просматривали на электронных микроскопах JEM 100CX и JEOL 1500. Автор приносит глубокую благодарность Е. Б. Голубевой за помощь в проведении эксперимента, фиксации и заливке материала.

<sup>1</sup> В зарубежной литературе этот вид известен как *D. pseudospathaceum* (Niewiadomska, 1989).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Покровы церкарий. Тегумент церкарий *D. chromatophorum* представлен тонкой наружной цитоплазматической пластинкой, соединенной цитоплазматическими мостиками с нижележащими субтегументальными клетками (рис. 1, а; 2, а, б; см. вкл.). Апикальная поверхность эпителия имеет складчатый рельеф. Ассоциированный с наружной мембраной гликокаликс при данном способе фиксации выявляется как слабо выраженный тонкий, прерывистый слой (рис. 1, а, н; 2, в). Субмембранная гиалоплазма отчетливо дифференцирована, в ней обнаруживаются два слоя — наружный тонковолокнистый электронно-светлый слой и внутренний электронноплотный, плавно переходящий в также довольно плотное основное вещество более глубоких слоев цитоплазмы (рис. 1, н; 2, в, г). С наружной мембраной тегумента связаны небольшие электронно-прозрачные везикулы (рис. 1, а, н; 2, в, г), иногда подобные пузырьки выявляются и на некотором удалении от апикальной поверхности. Базальная мембрана эпителия образует редкие неглубокие инвагинации (рис. 1, а). Подстилающая ее тонкая пограничная пластинка и более толстый слой рыхловолокнистого межклеточного вещества. Ниже расположены отростки миоцитов, составляющие кольцевую и продольную мускулатуру (рис. 1, а; 2, а). Частые контакты типа полудесмосом связывают пограничную пластинку как с базальной поверхностью эпителия, так и с отростками мышечных клеток. Нередко эти контакты пространственно совпадают (рис. 1, а; 2, г). Тегумент церкарий *D. chromatophorum* вооружен шипиками (рис. 1, а). На разных участках тела их форма, размер и ориентация варьируют, однако тонкое строение оказывается сходным. Верхний заостренный конец шипа, выступающий над поверхностью эпителия, плотно одет апикальной мембраной, а расширенное основание упирается в базальную мембрану тегумента, под которой прослеживается небольшое локальное уплотнение пограничной пластинки (рис. 1, а). Материал шипов имеет кристаллоидную структуру, о чем свидетельствует его хорошо выраженная продольная исчерченность на срезах (рис. 1, а). При этом выявляется уплотнение вещества в базальной части шипа и иногда в его поверхностном слое, прилежащем к наружной плазматической мембране (рис. 1, а; 2, и). Нередко мышцы приближены к основаниям шипиков (рис. 1, а; 2, б), что наводит на мысль об их тесной функциональной связи. Секреторные включения тегумента представлены хаотично расположенными дисконидными гранулами (СГ-1), окруженными плазматической мембраной. На срезах они чаще всего выглядят палочковидными, реже овальными, иногда кольцевидными (рис. 1, а; 2, а, в, г). Составляет их гомогенный материал средней или высокой электронной плотности. Некоторая гетерогенность включений по плотности, по-видимому, отражает процесс созревания секрета. В наружную пластинку секреторные включения поступают из субтегументальных клеток. У зрелых церкарий секреторная функция этих желез близка к завершению, а сами клетки по существу представляют собой резервуары накопленного секрета (рис. 1, а; 2, а, б). Наружная пластинка содержит также незначительное количество митохондрий (рис. 1, а). Принципиальных различий в строении тегумента на разных участках тела церкарий не обнаружено (хвостовой придаток и мышечные органы в данной работе не рассматриваются).

Покровы развивающихся метацеркарий. Кожно-мускульный мешок 1-дневных метацеркарий *D. chromatophorum* во многом сохраняет описанное выше строение, однако в наружной пластинке становятся заметны и некоторые существенные изменения. Резко увеличивается плотность гликокаликса (рис. 1, б, о; 2, д, е). В значительном количестве появляются структуры своеобразного строения, названные нами «мультивезикулярными». Они имеют вид пузырьков, иногда довольно крупных (рис. 2, ж, з), ограниченных плазматической мембраной, внутри которых заключены мелкие везикулы округлой или сильно вытянутой формы. Мелкие везикулы отпочковываются от внутренней поверхности окружающих их более крупных (рис. 1, о; 3, а; см. вкл.) и могут значительно варьировать в количестве (рис. 2, ж, з). Многие мультивезикулярные структуры иногда связаны с апикальной мембраной тегумента узкой «перетяжкой» (рис. 1, о; 2, е). При этом гликокаликс наружной мембраны

плавно переходит в электронноплотное вещество, выстилающее изнутри стенку мультивезикулярного образования. Вокруг отверстий наблюдается как бы стягивающий их поясok электронноплотного материала (рис. 1, *о*; 2, *е*). Некоторые мультивезикулярные образования соприкасаются и с базальной поверхностью эпителия (рис. 1, *б*), однако четких картин слияния и перехода одной мембраны в другую обнаружить не удалось. В течение 1-х суток после заражения в тегументе начинаются постепенные изменения: укрупняются складки синцитиальной пластинки; увеличивается, но все еще остается небольшим количество митохондрий; чаще встречаются инвагинации базальной мембраны эпителия (рис. 1, *б*). Цитоплазматический матрикс тегумента, за исключением узкой полоски в апикальном слое, теряет электронную плотность (рис. 2, *д*). Местами заметно сокращается количество секреторных гранул. В субтегументальных клетках, унаследованных от церкарий, появляются крупные липидные капли и «пустые» участки цитоплазмы, лишенные секреторных включений (рис. 1, *б*). К 3-му дню развития эти клетки обнаруживают признаки усиливающейся дегенерации: количество секрета в них необратимо уменьшается, комплексы Гольджи и шероховатый ЭПР не выявляются, в цитоплазме появляются аутофагосомы и разнообразного вида остаточные тельца, в том числе мультиламеллярные (рис. 1, *в*). Часть мультиламеллярных тел и липидных включений выводится вместе с секреторными гранулами в наружный синцитий (рис. 1, *в*; 2, *з, и*). Одновременно под мышечными слоями дифференцируются клетки, представляющие новое (первое для метацеркарий) поколение цитонов тегумента. Для них характерно крупное ядро с большим ядрышком, шероховатый ЭПР со слегка расширенными цистернами, множество свободных рибосом (рис. 2, *и*), хорошо выраженные комплексы Гольджи и немногочисленные мелкие секреторные включения разнообразной формы, заполненные тонкозернистым материалом (рис. 1, *в*). У 3-дневных метацеркарий эти клетки еще не связаны с эпителиальной пластинкой покровов (рис. 1, *в*). На 5-е сутки после заражения процесс дегенерации «церкарных» субтегументальных клеток завершается распадом их цитоплазмы на отдельные фрагменты (рис. 3, *г*). Вместе с тем цитоны нового поколения переживают фазу активного синтеза секрета (рис. 3, *б*), при этом они различаются по составу секреторных включений. В одних обнаружены два типа гранул: мелкие включения неправильно-овальной формы, окруженные мембраной и заполненные тонкозернистым материалом средней и высокой электронной плотности (*СГ-2*), а также описанные ранее дисковидные гранулы *СГ-1* (рис. 1, *г*); другие клетки содержат только *СГ-2* (рис. 1, *г*; 3, *б*). По-видимому, субтегументальные клетки данной генерации обладают способностью к синтезу двух разных типов секрета, который протекает в них несинхронно. У 5-дневных метацеркарий они уже соединены цитоплазматическими мостиками с наружной синцитиальной пластинкой (рис. 1, *г*; 3, *в*). Рельеф апикальной поверхности последней заметно выравнивается, а цитоплазматический матрикс становится более электронноплотным (рис. 3, *а*). Строение шипиков, базальной пластинки и мышечной стенки тела в первые 5 дней после заражения остается таким же, как у церкарий, и в дальнейшем не испытывает существенных изменений до 33—34-суточного возраста метацеркарий (рис. 1, *б—к*).

На 6-й день развития большинство мультивезикулярных структур открывается на поверхность тела, а их содержимое выбрасывается наружу (рис. 1, *д*; 3, *д*). Вслед за этим утрачивает свою плотность гликокаликс, нарушается, а затем и полностью исчезает слоистая структура субмембранной гиалоплазмы (рис. 1, *е, ж*; 3, *е, з*). Вновь усиливается складчатость апикальной поверхности (рис. 1, *д, е*; 3, *д, е, з*). У 7-дневных метацеркарий на ней появляются единичные пальцевидные выросты (рис. 1, *е*; 3, *е*), а к 10-му дню развития уже вся поверхность тела несет микроворсинки (рис. 1, *ж*; 3, *з*). Одновременно возрастает и число инвагинаций базальной мембраны эпителия (рис. 1, *е, ж*; 3, *з*). С 7-дневного возраста от его апикальной поверхности начинают отшнуровываться в виде везикул участки электронно-светлой цитоплазмы (рис. 1, *е*; 3, *е*). Секреторные включения тегумента становятся все более малочисленными (рис. 1, *д—ж*; 3, *е, з*). С 6-го дня развития в субтегументальных клетках и в базальном слое тегумента появляются электронно-прозрачные вакуоли (рис. 1, *д*). У 7—10-днев-

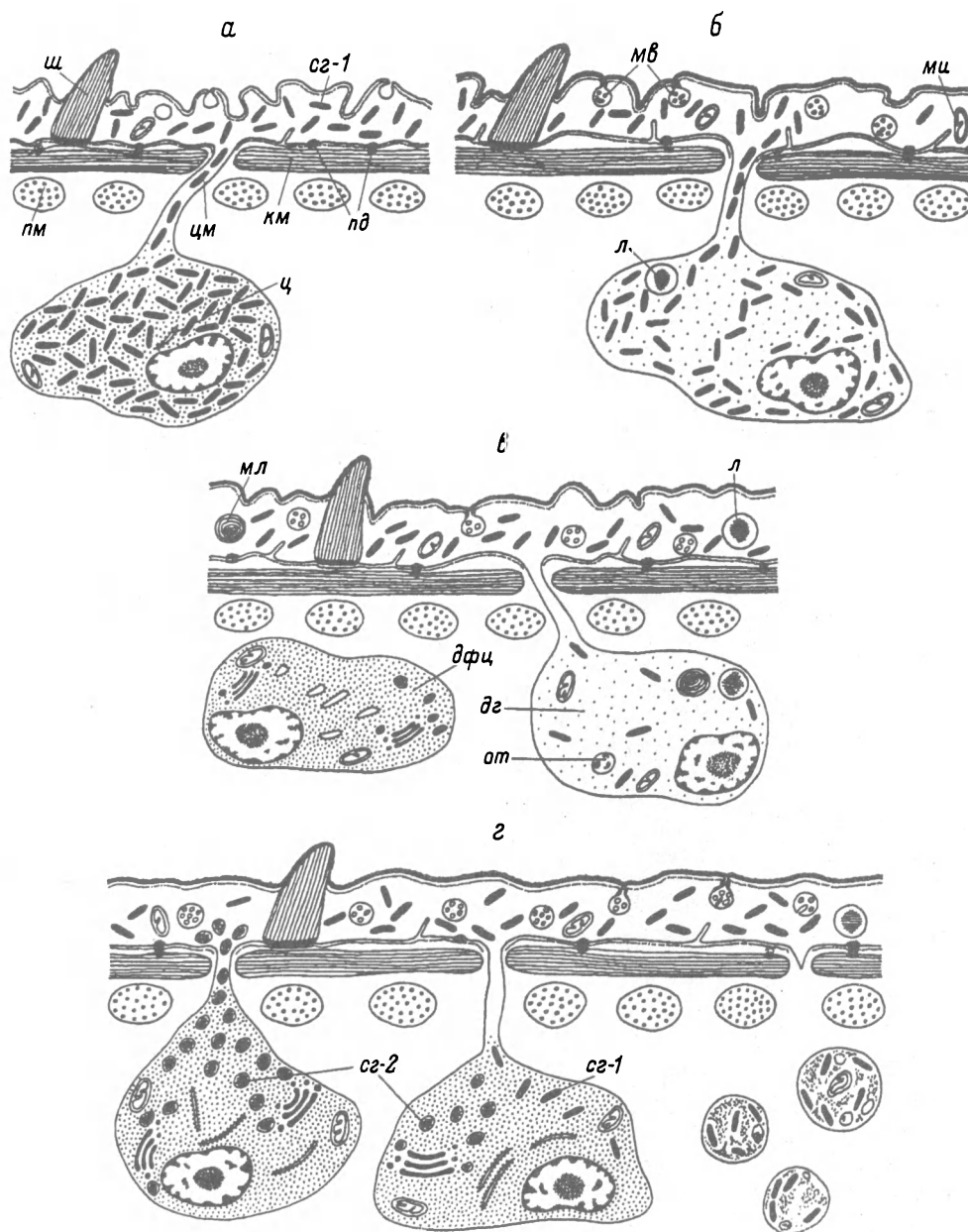


Рис. 1. Схема строения покровов зрелых церкарий и развивающихся метациркардий *D. chromatophorum*.

а — зрелая церкария; б — 1-й день развития (д. р.); в — 3-й д. р.; г — 5-й д. р.; д — 6-й д. р.; е — 7-й д. р.; ж — 10-й д. р.; з — 12-й д. р.; I — дорсальная, II — вентральная поверхности; и — 20-й д. р., вентральная поверхность; к — 34-й д. р.; л — 40—49-й д. р.; м — участок локальной реорганизации тегумента; н — участок апикальной поверхности тегумента церкарий; о — участок апикальной поверхности суточных метациркардий; ва — вакуоли; г — гликокаликс; дфц — дифференцирующийся цитон; дц — дегенерирующий цитон; зш — зачатки шипов; кс — включения кристаллоидного материала; км — кольцевые мышцы; л — липиды; мв — мультивезикулярные структуры; ми — митохондрии; мл — мультиламеллярные тела; мс — микроворсинки; н — полости; нд — полудесмосомы; пм — продольные мышцы; пп — пограничная пластинка; от — остаточные тела; СГ-1—СГ-7 — секреторные включения тегумента; сн — секреторный проток; ссг — субмембранные слои гиалоплазмы; чм — «четковидная» мембрана; ц — цитон; цм — цитоплазматический мостик; эп — эпителиальная пластинка.

Fig. 1. Diagram of the tegument ultrastructure of mature cercariae and developing metacercariae of *D. chromatophorum*.

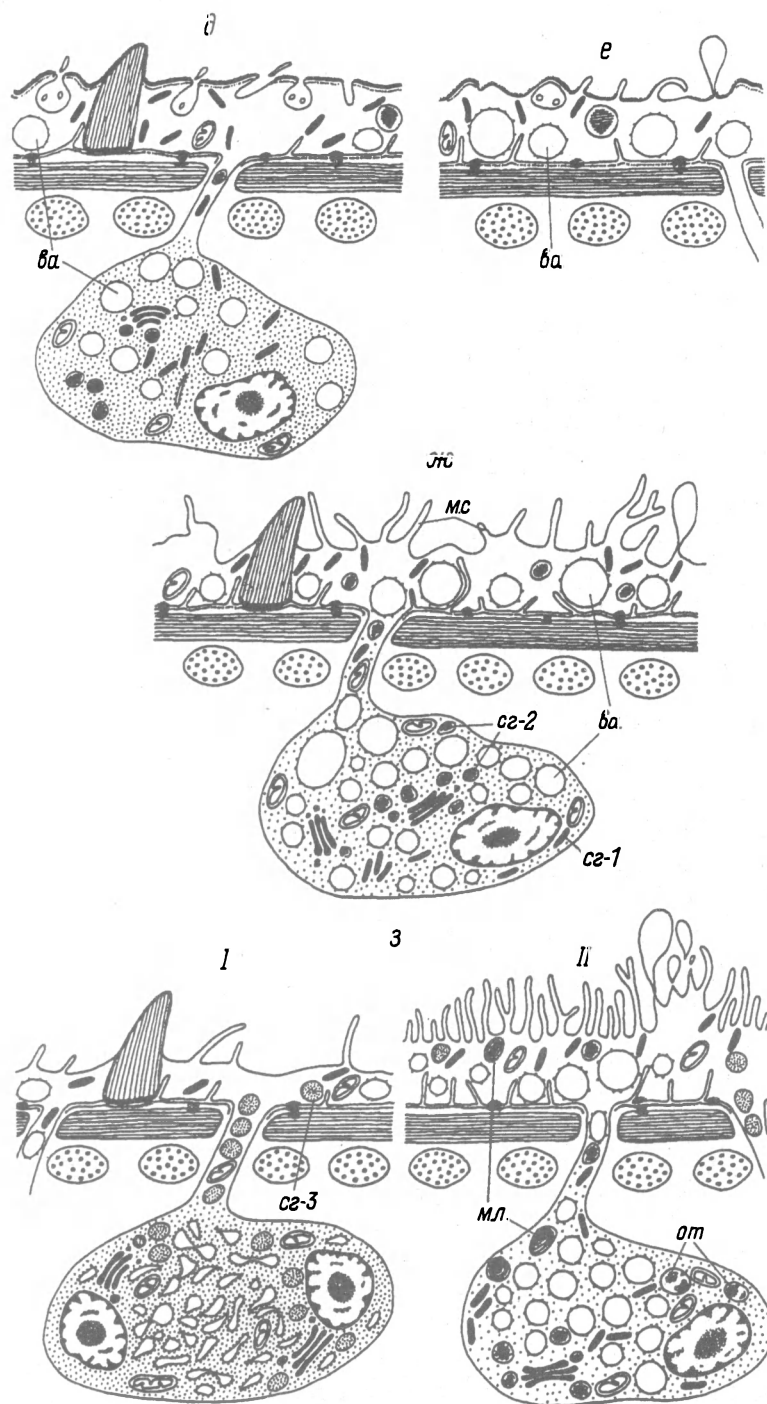


Рис. 1 (продолжение).

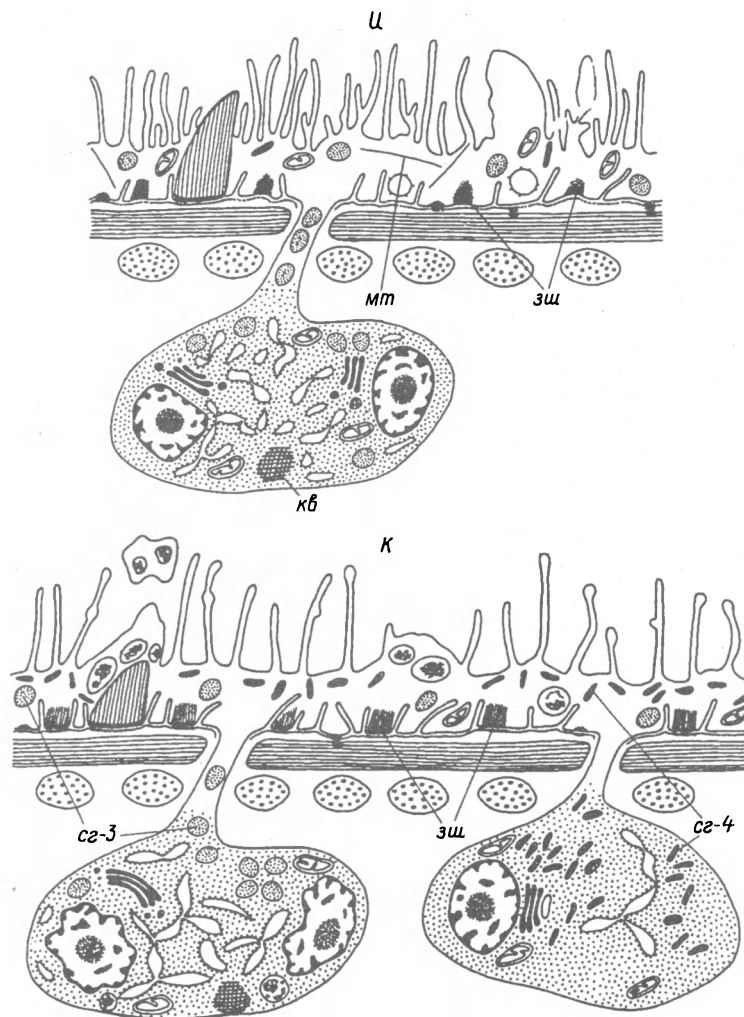


Рис. 1 (продолжение).

ных метацеркарий их количество заметно возрастает (рис. 1, е, ж; 3, ж). Появляются эти структуры очень быстро, проследить детали этого процесса не удалось. В наружную пластинку вакуоли поступают подобно секреторным включениям из цитоннов (рис. 3, ж). При этом туда же попадают и зачастую связанные с ними рибосомы (рис. 1, ж; 3, з). Субтегументальные клетки метацеркарий 6—10 дней развития имеют единый план строения. Для них характерно наличие небольшого количества секреторных включений *СГ-1* и *СГ-2*, а также многочисленных электронно-прозрачных вакуолей в цитоплазме (рис. 1, д; 3, е, ж).

К 12-му дню развития намечается морфофункциональная дифференцировка тегумента на дорсальной и вентральной поверхностях тела метацеркарий («латеральный» тегумент по строению близок к «дорсальному»). На дорсальной стороне покровный эпителий заметно тоньше, беднее секреторными включениями и несет лишь редкие поверхностные выросты; инвагинации базальной мембраны здесь также немногочисленны (рис. 1, з/; 3, к). Тегумент вентральной поверхности, особенно ее центральной части, напротив, имеет густую сеть микроворсинок и развитую систему инвагинаций базальной мембраны, содержит большое количество электронно-прозрачных вакуо-

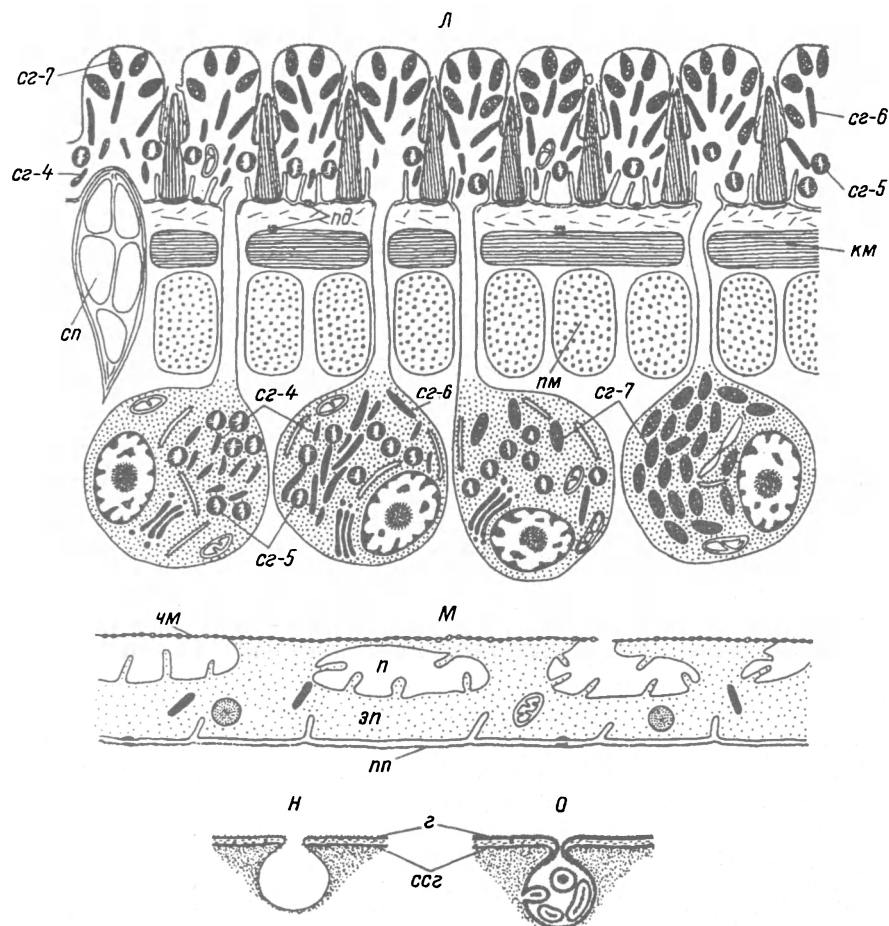


Рис. 1 (продолжение).

лей и более многочисленные секреторные включения (рис. 1, зII; 3, и). Процесс отпочковывания от наружной поверхности тегумента разнообразного вида везикул, аналогичный наблюдавшемуся у 7—10-дневных метацеркарий, продолжается и на 12-е сутки развития на брюшной стороне тела вблизи ацетабулюма (рис. 1, зI; 3, и). У метацеркарий этого возраста обнаружен новый тип субтегументальных клеток, соединенных отростками с наружной пластинкой (рис. 1, з; 4, а, г; см. вкл.). Им свойственно наличие 2, а возможно и 3, ядер, а также хорошо развитая система шероховатого ЭПР с характерно расширенными цистернами. Вместе с тем нельзя исключить, что имеются и одноядерные цитоны сходного строения. Весьма малочисленные секреторные включения этих клеток СГ-3 окружены мембраной, имеют на срезах округлую форму и состоят из гомогенного материала средней электронной плотности. Внешне они похожи на овальные секреторные гранулы СГ-2, образующиеся в цитонах предыдущего поколения, однако полностью не идентичны им. Одновременно сохраняется небольшое количество цитонов, характерных для 6—10-дневных метацеркарий (рис. 1, з). Однако появляются некоторые признаки их старения и дегенерации, например многочисленные остаточные тела, встречающиеся также в близлежащих участках цитоплазматической пластинки (рис. 1, зII).

Тенденции в развитии покровов, отмеченные для 12-го дня развития, в целом сохраняются и у 20-дневных метацеркарий. На дорсальной стороне тела тегумент



практически не меняется. Вместе с тем апикальная поверхность «вентрального» тегумента продолжает увеличиваться, особенно в зоне впадины вокруг брюшной присоски, за счет развития длинных, густо расположенных микроворсинок. Местами среди них встречаются высокие толстые выросты цитоплазмы со сравнительно гладкой поверхностью (рис. 1, и; 4, д). Электронно-прозрачные вакуоли в эпителиальной пластинке резко сокращаются в количестве, секреторные включения становятся еще более редкими (рис. 1, и; 4, е). Для тегумента личинок этого возраста характерно наличие микротрубочек (рис. 4, е) и возросшее количество митохондрий (рис. 1, и). На брюшной стороне тела над базальной мембраной тегумента появляются регулярно расположенные сгущения электронноплотного материала, представляющие собой зачатки нового вооружения покровов (рис. 1, и; 4, е). У 20-суточных метацеркарий они еще не имеют отчетливо выраженной кристаллоидной структуры, как «старые» шипики, унаследованные от церкарий (рис. 1, и; 4, е). Все субтегументальные клетки на этом этапе развития имеют один тип строения — многоядерных цитонов, продуцирующих секреторные включения СГ-3 (рис. 1, и). От аналогичных образований 12-дневных метацеркарий они отличаются только появлением в цитоплазме скоплений кристаллоидного материала (рис. 4, б).

У 12- и 20-дневных метацеркарий, кроме того, в различных частях поверхности тела многократно наблюдались отдельные зоны тегумента с совершенно особым типом организации. Для этих участков характерна гладкая апикальная поверхность (рис. 1, м; 4, ж). Наружная плазматическая мембрана при фиксации образует здесь своеобразную четковидную структуру: короткие отрезки мембраны, имеющие обычное строение, чередуются с пузырьковидными «вздутиями» (рис. 1, м; 4, ж, з). Под апикальной поверхностью находятся полости, иногда довольно обширные, ограниченные типичной плазматической мембраной. Внутренняя поверхность этих полостей образует выросты, сходные с теми, которые несут немодифицированные участки тегумента (рис. 1, м; 4, з). На электронограммах видно, что некоторые полости открываются наружу, при этом выстилающая их мембрана переходит в апикальную мембрану тегумента, над которой в виде козырьков сохраняются остатки «четковидной» мембраны (рис. 1, м; 4, з). Совершенно очевидно, что на описанных выше участках происходит локальная интенсивная реорганизация апикальной поверхности эпителия.

В общих чертах характерная для 12—20-дневных метацеркарий организация покровов сохраняется до 33—34-суточного возраста, за исключением того, что различия в строении дорсальной и вентральной поверхностей тела постепенно сглаживаются. Начиная с 34—35-го дней развития тегумент и весь кожно-мускульный мешок претерпевают еще одну глубокую перестройку, в результате которой формируются покровы, характерные уже для инвазионных метацеркарий. Отдельные фрагменты этих преобразовательных процессов нам удалось наблюдать у 34-дневных метацеркарий. В этом возрасте или чуть позже тегумент утрачивает поверхностные выросты. Перед исчезновением на микроворсинках появляются многочисленные шаровидные вздутия (рис. 1, к), ранее встречавшиеся только эпизодически. Шипы, вооружавшие покровы церкарий, еще сохраняются, но при этом явно подвержены дегенерации (рис. 1, к; 5, ж; см. вкл.). Они деформируются, в окружающей их цитоплазме концентрируются вакуоли, по виду напоминающие аутофагические, от наружной поверхности эпителия часто можно наблюдать отшнуровывание небольших участков цитоплазмы с вакуолями и разнообразных остаточных фрагментов. Одновременно зачатки нового вооружения тегумента все больше становятся похожими на основания будущих шипов: они приобретают более четкие контуры, выявляется филаментозная структура образующего их материала, уплотненного в базальной части. Подлежащие участки пограничной пластинки также уплотняются (рис. 1, к; 5, з). В тегументе накапливается значительное количество секреторных включений, в том числе гранулы СГ-3 и мелкие включения нового типа СГ-4 (рис. 1, к; 5, з), образующиеся во вновь дифференцированных одноядерных цитонах. Отдельные цистерны шероховатого ЭПР в этих клетках также расширены (рис. 1, к). В сечении



гранулы выглядят палочковидными, реже овальными (рис. 5, и). От внешне похожих на них дисковидных включений *СГ-1* они отличаются меньшими размерами и гетерогенной структурой составляющего их материала. У 34-дневных метацеркарий еще сохраняются цитоны, продуцирующие округлые гранулы *СГ-3* (рис. 1, к). В некоторых из них ядерная оболочка становится складчатой, а в цитоплазме накапливаются аутофагосомы и остаточные тельца.

К 40-му дню развития толщина покровного эпителия увеличивается более чем в 2—3 раза. Полностью исчезает церкарное вооружение. Его заменяют тонкие, часто расположенные конусовидные шипики, по высоте не превышающие толщину тегумента (рис. 1, л; 5, а). При этом только нижняя их часть погружена в цитоплазматическую пластинку, а плотно одетые наружной мембраной верхушки выступают в просвет глубоких впячиваний апикальной поверхности, совпадающих с расположением шипов (рис. 1, л; 5, а, в). Вновь образованные шипы также состоят из кристаллоидного материала и имеют электронноплотный слой в основании (рис. 1, л). Надмембранный комплекс отчетливо выявляется на всей поверхности тегумента, в упомянутых впячиваниях он развит особенно сильно и имеет хорошо выраженную волокнистую структуру (рис. 1, л; 5, б). Наблюдается также отшнуровывание мелких везикул в просвет впячиваний (рис. 1, л; 5, б, в). Под апикальной мембраной эпителия заметно небольшое уплотнение цитоплазматического матрикса (рис. 5, в). Базальная мембрана тегумента образует тонкие пластинчатые инвагинации (рис. 1, л; 5, з). Тегумент 40-дневных метацеркарий содержит довольно редкие митохондрии и большое количество секреторных включений, окруженных плазматической мембраной (рис. 1, л). Среди них выделяются 4 типа гранул. Мелкие палочковидные включения *СГ-4*, отмеченные ранее у 34-суточных метацеркарий, встречаются во всех слоях цитоплазматической пластинки (рис. 1, л; 5, б). Остальные три типа появляются к 40-му дню развития впервые. Округлые небольшие электронно-светлые гранулы *СГ-5* локализуются в базальной зоне эпителия (рис. 1, л; 5, б). Крупные палочковидные включения, содержащие электронноплотный волокнистый секрет *СГ-6*, большей частью сосредоточены в средней его части, часто вблизи наружной плазматической мембраны впячиваний (рис. 1, л; 5, б, в). Неправильно-овальные гранулы с «ячеистой» структурой электронноплотного секреторного материала *СГ-7* концентрируются в среднем и апикальном слоях тегумента также вблизи его наружной мембраны (рис. 1, л; 5, в). Все перечисленные секреторные включения образуются в субтегументальных клетках, соединяющихся с тегументом цитоплазматическими мостиками (рис. 1, л; 5, а). Цитоны 40-дневных метацеркарий одноядерные, имеют строение, типичное для секреторно активных клеток. Судя по вариациям в наборе секреторных включений в разных цитонах (рис. 1, л; 5, д, е), все они представлены одним типом клеток, поэтапно продуцирующих все типы секреторных гранул тегумента. Начиная с 33—34-дневного возраста метацеркарий наблюдается резкое увеличение массы мышечных пучков, в особенности представляющих продольную мускулатуру (рис. 1, л; 5, а). Так же существенно возрастает и толщина слоя межклеточного вещества между тегументом и мышцами (рис. 1, л; 5, а, з). Мышцы образуют с этим слоем контакты типа полудесмосом, которые не связаны пространственно с контактами базальной мембраны эпителия с пограничной пластинкой (рис. 1, л), как это было отмечено для более ранних стадий развития. Не наблюдалось и признаков структурной связи мышц с шипами. К базальной поверхности тегумента 40-дневных метацеркарий вплотную подходят, глубоко выгибая ее изнутри, укрепленные микротрубочками протоки одноклеточных желез, заполненные крупными и реже мелкими гранулами гомогенного электронно-светлого секрета (рис. 1, л; 5, з). Сами железы находятся в глубине тела и представляют собой секреторно активные клетки типичного строения. Исследование полностью сформированных 49-дневных метацеркарий не выявило принципиальных изменений в строении покровов после 40-го дня их развития.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Строение кожно-мускульного мешка церкарий *D. chromatophorum* в целом не выходит за рамки сложившихся представлений об организации этой системы у свободноплавающих личинок гермафродитного поколения трематод (Галактионов, Добровольский, 1987, 1998, и др.). Оно характеризуется отсутствием цистогенного аппарата и дифференцированным кутикулярным вооружением, являющимся частью сложноспециализированного пенетрационного комплекса. Упомянутые шипы являются ценогенетическими образованиями, что подтверждается их последующей дегенерацией на фазе метацеркарии. В тонкой морфологии покровов изученных церкарий прослеживаются признаки усиления их механической прочности. Так, отчетливо выраженная двухслойная структура апикальной зоны гиалоплазмы, по-видимому, представляет собой модификацию цитоскелета, укрепляющую поверхность покровного эпителия. «Зеркальное» расположение полудесмосом, связывающих пограничную пластинку с эпителием и мышцами, должно способствовать повышению жесткости общей конструкции кожно-мускульного мешка. При проникновении во II промежуточного хозяина и в ходе сложной, в том числе активной, миграции в нем личинкам *D. chromatophorum* приходится преодолевать различные тканевые барьеры (Шигин, 1986; Szidat, 1924; Erasmus, 1959 и др.), что сопряжено с ощутимыми механическими нагрузками. Видимо, этим обстоятельством и обусловлено возникновение отмеченных микроадаптаций.

В сложном процессе развития покровов метацеркарий *D. chromatophorum*, подробно описанном выше, ясно просматриваются три основные стадии, характеризующиеся в целом относительно постоянной ультраструктурной организацией, разделенные между собой сравнительно короткими «перестроечными» периодами. По времени эти стадии вполне определенно коррелируют с первыми тремя этапами развития самих паразитов, выделенными Шигиным (1986) на основании динамики их линейного роста.

Основное содержание короткого начального этапа развития метацеркарий *D. chromatophorum*, маркированного заметным уменьшением размеров их тела, составляют интенсивная резорбция большинства ценогенетических структур церкарий и глубокая морфофункциональная перестройка пищеварительной системы. В этот период (первые 5—6 дней пребывания во II промежуточном хозяине) покровы в целом сохраняют основные черты церкарной организации. Характерной особенностью данной стадии становится появление невысокого, но чрезвычайно плотного гликокаликса, в чем, очевидно, проявляется защитная реакция паразита на иммунное воздействие хозяина. Аналогичная протективная функция приписывается надмембранному комплексу тегумента ювенильных форм *Fasciola hepatica* (Hanna, 1980) и молодых метацеркарий некоторых микрофаллид (Galaktionov e. a., 1996). Вероятно, на некоторых этапах развития она имеет место у многих трематод. Образование и возобновление гликокаликса тегумента сосальщиков осуществляется путем экзоцитоза определенных секреторных включений наружного синцития (Галактионов, Добровольский, 1987, 1998). В тегументе метацеркарий *D. chromatophorum* первых дней развития эту функцию могут выполнять только единственно присутствующие в нем гранулы *CG-1*, в большом количестве запасенные на стадии церкарии. Всему периоду существования упомянутого надмембранного комплекса сопутствует образование в цитоплазматической пластинке мультивезикулярных структур, по существу представляющих собой глубокие инвагинации ее наружной мембраны. Возможно, в данном случае мы наблюдаем своеобразный регуляторный механизм, позволяющий сохранять площадь апикальной поверхности при массовом экзоцитозе секреторных включений. В пользу высказанного предположения свидетельствует и анализ электронограмм мигрирующих диплостомул близкого вида *D. spathaceum*, исследованных Хоглундом (Hoglund, 1991). На них отчетливо видно, что мультивезикулярные структуры (ошибочно определенные автором как ресничные) и плотный гликокаликс появляются в тегументе личинок одновременно,

практически сразу после их внедрения в хозяина, что сопровождается резким сокращением количества секреторных включений.

Примерно с 7-го дня развития пищеварительная система метацеркарий *D. chromatophorum* начинает функционировать, паразиты приступают к активному питанию тканью хрусталика, и вместе с этим наступает период их бурного роста и морфогенеза (7—35-е дни развития в условиях опыта). Для этого этапа развития в целом характерна организация тегумента, описанная нами у 12—20-дневных метацеркарий. Для нее типичны развитая система микроворсинок, многочисленные инвагинации базальной мембраны и возросшее количество митохондрий. Перечисленные признаки свидетельствуют о резком возрастании приоритета абсорбционной функции покровного эпителия (Галактионов, Добровольский, 1998; Smyth, Halton, 1983). Корреляция этих признаков с ростом и морфогенезом, требующим больших энергетических затрат, дает основания полагать, что на данной стадии развития покровы наряду с кишечником активно участвуют в поглощении питательных веществ. Во многом сходную специализацию испытывает тегумент метацеркарий и у других трематод, развитие которых во II промежуточном хозяине сопровождается ростом и морфогенезом, при этом, как и у *D. chromatophorum*, она по времени совпадает с наиболее интенсивным течением этих процессов (Popiel, 1976; Galaktionov e. a., 1996 и др.). В это же время закладываются зачатки дефинитивного вооружения покровов. Предполагается, что материал шипов синтезируется в форме мономеров в субтегументальных клетках, откуда в свободном виде поступает в наружный синцитий (Bennet, Threadgold, 1975; Fukuda e. a., 1987). У метацеркарий *D. chromatophorum* эту функцию, видимо, осуществляют многоядерные цитоны с характерно расширенными цистернами мощно развитого шероховатого ЭПР наряду с секрецией малочисленных гранул типа СГ-3. Ультраструктура упомянутых субтегументальных клеточных комплексов демонстрирует чрезвычайную интенсификацию синтетической активности. Вполне вероятно, что они продуцируют и другие вещества, необходимые для построения быстро разрастающейся наружной пластинки. Отмеченное на данной стадии развития отпочковывание от апикальной поверхности тегумента разнообразных везикул и фрагментов может быть связано с разными процессами, в том числе и с удалением конечных продуктов катаболического обмена. Нужно отметить, что выделительная функция покровного эпителия проявляется на всем протяжении развития метацеркарий *D. chromatophorum*. Из цитонов в наружную пластинку на разных сроках развития поступают остаточные тела и липидные капли, которые затем выводятся наружу. Экскреторная функция тегумента отмечена в ходе развития метацеркарий и у других видов сосальщиков (Popiel, 1976).

Примечательной особенностью тегумента метацеркарий *D. chromatophorum* второго этапа развития является наблюдавшаяся нами локальная реорганизация его апикальной поверхности, не описанная ранее у других трематод. В настоящее время трудно дать однозначное толкование этому явлению. Возможно, что в период бурного роста паразитов таким образом «добраивается» сложноспециализированный поверхностный аппарат покровного эпителия. Описанные процессы можно представить себе и как дополнительный механизм регенерации. Необходимость такого постоянного оперативного обновления поверхностных структур легко понять, учитывая полное отсутствие на данной стадии развития каких-либо защитных приспособлений (цисты или осуществляющего защитную функцию гликокаликса).

Третий этап развития паразитов (35—50-е дни развития в условиях опыта), определенный Шигиным (1986) как «период созревания», заканчивают уже инвазионные метацеркарии. Он сопровождается повторным уменьшением размеров тела и приостановкой морфогенетических процессов. На соответствующей ему стадии развития покровы метацеркарий *D. chromatophorum*, как и у других изученных трематод (Bibby, Rees, 1971a; Kechemir, 1978; Galaktionov e. a., 1996, и др.), приобретают основные черты дефинитивной организации. Видимо, это является общим правилом и необходимым условием успешного заражения окончательного хозяина. Остатки церкарного вооружения заменяются дефинитивными шипиками. Наружный синцитий

заполняется секреторными включениями, сходными с описанными у марит других изученных стригейдид (Erasmus, 1967; Bibby, Rees, 1971a, и др.). Резко возрастает толщина эпителиальной пластинки, слоя межклеточного вещества и мышечных слоев стенки тела. В паренхиме дифференцируются железы с протоками, функциональная активность которых также приурочена к фазе мариты (Галактионов, Добровольский, 1987, 1998). С приостановкой роста трофическая функция покровов угасает, о чем свидетельствует исчезновение в тегументе митохондрий, а также (косвенно) заметное сокращение в нем количества митохондрий. Вместе с тем на примере *D. phoxini* было показано, что способность тегумента к адсорбции питательных веществ у зрелых метацеркарий диплостомумов полностью не исчезает (Bibby, Rees, 1971b). Доминирующей функцией вновь хорошо выраженного своеобразного гликокаликса, по-видимому, снова становится защитная. Сходный по структуре надмембранный комплекс обнаружен и у зрелых метацеркарий *D. phoxini* (Bibby, Rees, 1971a). Очевидно, в определенной степени он функционально замещает отсутствующую у этих трематод цисту. Субтегументальные клетки, характерные для данной стадии развития, обладают ярко выраженной железистой функцией: они поэтапно продуцируют все типы секреторных включений, обильно заполняющих наружную цитоплазматическую пластинку. Пример аналогичной «многообразной» многоступенчатой секреторной деятельности цитонов тегумента трематод подробно описан у *Paragonimus* sp. (Fukuda, 1986).

Проведенный анализ показывает, что на изученном отрезке онтогенеза тегумент *D. chromatophorum* несет большую и разнообразную функциональную нагрузку, приоритеты в которой неоднократно меняются. Это находит отражение в конкретных особенностях тонкого строения рассмотренных выше стадий развития покровов. Функциональная нагрузка тегумента исследованных паразитов, в свою очередь, во многом определяется особенностями их биологии, а также спецификой паразито-хозяйинных отношений. Сложные морфологические дифференцировки, описанные в покровах развивающихся метацеркарий, свидетельствуют о глубоких метаболических и иммунологических взаимодействиях в системе метацеркарии *D. chromatophorum* — II промежуточный хозяин.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (№ проекта 98-04-49706).

#### Список литературы

- Галактионов К. В., Добровольский А. А. Гермафродитное поколение трематод. Л., 1987. 192 с.
- Галактионов К. В., Добровольский А. А. Происхождение и эволюция жизненных циклов трематод. СПб.: Наука, 1998. 404 с.
- Шигин А. А. Трематоды фауны СССР: Род *Diplostomum*. Метацеркарии. М.: Наука, 1986. 253 с.
- Bennett C. E., Threadgold L. T. *Fasciola hepatica*: development of the tegument during migration in the mouse // Exp. Parasitol. 1975. Vol. 38. P. 38—55.
- Bibby M. C., Rees G. The ultrastructure of the epidermic and associated structures in the metacercaria, cercaria and sporocyst of *Diplostomum phoxini* (Faust, 1918) // Z. Parasitenk. 1971a. Bd 37. S. 169—186.
- Bibby M. C., Rees G. The uptake of radio-active glucose in vivo and in vitro by the metacercaria of *Diplostomum phoxini* (Faust, 1918) and its conversion to glycogen // Z. Parasitenk. 1971b. Bd 37. S. 187—197.
- Erasmus D. A. The migration of cercariae X Baylis (Strigeida) within the fish intermediate host // Parasitology. 1959. Vol. 49. P. 173—190.
- Erasmus D. A. The host-parasite interface of *Cyathocotyle bushiensis* Khan, 1962 (Trematoda: Strigeoidea). II. Electron microscope studies of the tegument // J. Parasit. 1967. Vol. 53. P. 703—714.
- Fukuda K. Differentiation and degeneration of tegumental cells in adult lung fluke, *Paragonimus* sp. (Trematoda: Troglotreematidae) // Int. J. Parasitol. 1986. Vol. 16. P. 147—156.
- Fukuda K., Fujino T., Hirata M. Ultrastructural characterization of tegumental spines of the adult lung fluke *Paragonimus westermani* // Z. Parasitenk. 1987. Bd 73. S. 95—97.

- Galaktionov K. V., Malkova I. I., Irwin S. W. B., Saville D. H., Maguire J. G. Developmental changes in the tegument of four microphallid metacercariae in their second (crustacean) intermediate hosts // J. Helminthol. 1996. Vol. 70. P. 201—210.
- Hanna R. E. B. Fasciola hepatica: glycocalyx replacement in the juvenile as a possible mechanism for protection against host immunity // Exp. Parasitol. 1980. Vol. 50. P. 103—114.
- Higgins J. C. Formation of the cyst wall and related changes in the structure of the tegument of Bucephalus haimeanus (Lacaze-Dutheils, 1854) during its metamorphosis from the cercarial to metacercarial stages // Parasitology. 1980. Vol. 81. P. 47—59.
- Hoglund J. Ultrastructural observations and radiometric assay on cercarial penetration and migration of the digenean Diplostomum spathaceum in the rainbow trout Oncorhynchus mykiss // Par. Res. 1991. Vol. 77. P. 283—289.
- Kechemir N. Evolution ultrastructurale du tegument d'[Halipegus ovocaudatus Vulpian 1858 au cours de son cycle biologique // Z. Parasitenk. 1978. Bd 57. S. 17—33.
- Niewiadomska K. On the synonymy of Diplostomum pseudospathaceum Niewiadomska, 1984 (Digenea, Diplostomidae) // Acta Parasit. Polon. 1989. Vol. 34. P. 103—106.
- Popiel J. The ultrastructure of the metacercaria of Cercaria stunkardi Palombi, 1934 (Digenea: Opecoelidae) in an experimental intermediate host, Amphithoe rubricata // Norw. J. Zool. 1976. Vol. 24. P. 353—364.
- Smyth J. D., Halton D. W. The physiology of trematodes. Cambridge: Cambridge University Press, 1983. 446 p.
- Szidat L. Beitrage zur Entwicklungsgeschichte der Holostomiden II // Zool. Anz. 1924. Vol. 61. P. 249—266.

ЗИН РАН, Санкт-Петербург, 199034

Поступила 23.11.1998

# THE FINE STRUCTURE OF THE TEGUMENT OF CERCARIAE AND DEVELOPING METACERCARIAE OF DIPLOSTOMUM CHROMATOPHORUM (TREMATODA: DIPLOSTOMIDAE)

I. M. Podvyaznaya

**Key words:** tegument, development, *Diplostomum chromatophorum*, *D. pseudospathaceum*, ultrastructure.

## SUMMARY

The morphology of the tegument of invasive cercariae and metacercariae of *Diplostomum chromatophorum* at different intervals after the penetration into the experimental intermediate host *Cyprinus carpio* (1, 3, 5, 6, 7, 10, 12, 20, 34, 40, 49 days) has been investigated. The developmental changes observed in epidermis of metacercariae are divided into three consecutive stages. At the first short stage the tegument and associated structures resemble in general those described for cercariae. Dense glycocalyx noted at this stage is proposed to protect parasites from the host's immune response. The second stage coincides with the period of intensive growth and development of metacercariae. During this time the tegument is seemingly involved in the nutrient absorption. Its free surface area is elevated by long numerous microvilli, the basal membrane forms frequent deep invaginations, the number of mitochondriae is noticeably increased. On this background the process of intensive local reorganization of surface structures was observed. At the third stage the tegument acquires the main features of adult worm epidermis. The well developed filamentous glycocalyx appears on its surface again.

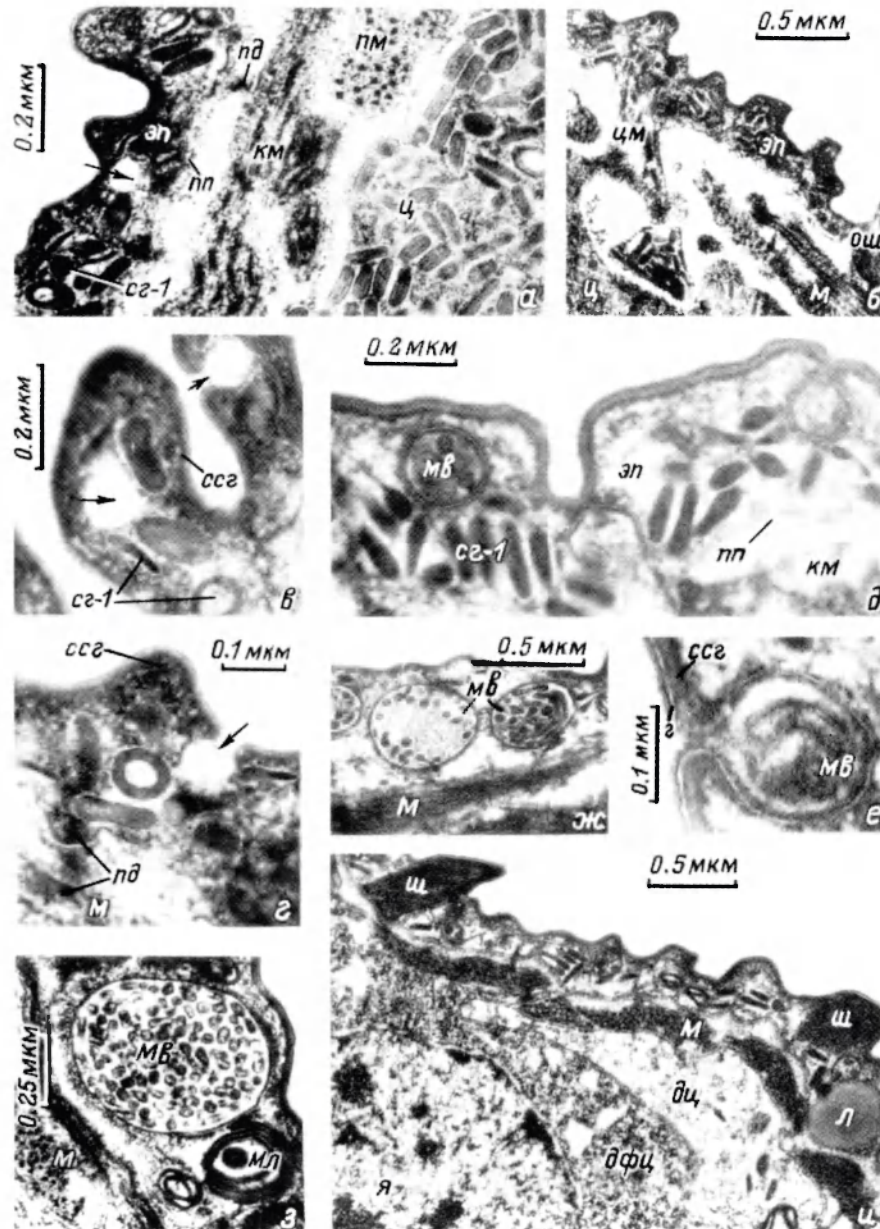


Рис. 2. Покровы церкарий и метациркарий 1—3 дней развития *D. chromatophorum*.  
 а, б — стенка тела церкарий; в, г — фрагменты покровного эпителия церкарий; д, е — тегумент метациркарий (МЦ) 1-го д. р.; ж—и — тегумент МЦ 3-го д. р.; м — мышцы; ош — основание шипа; я — ядро; стрелка — пузырьки в тегументе церкарий.  
 Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

Fig. 2. Body wall fragments of cercariae and 1—3-day-old *D. chromatophorum* metacercariae.



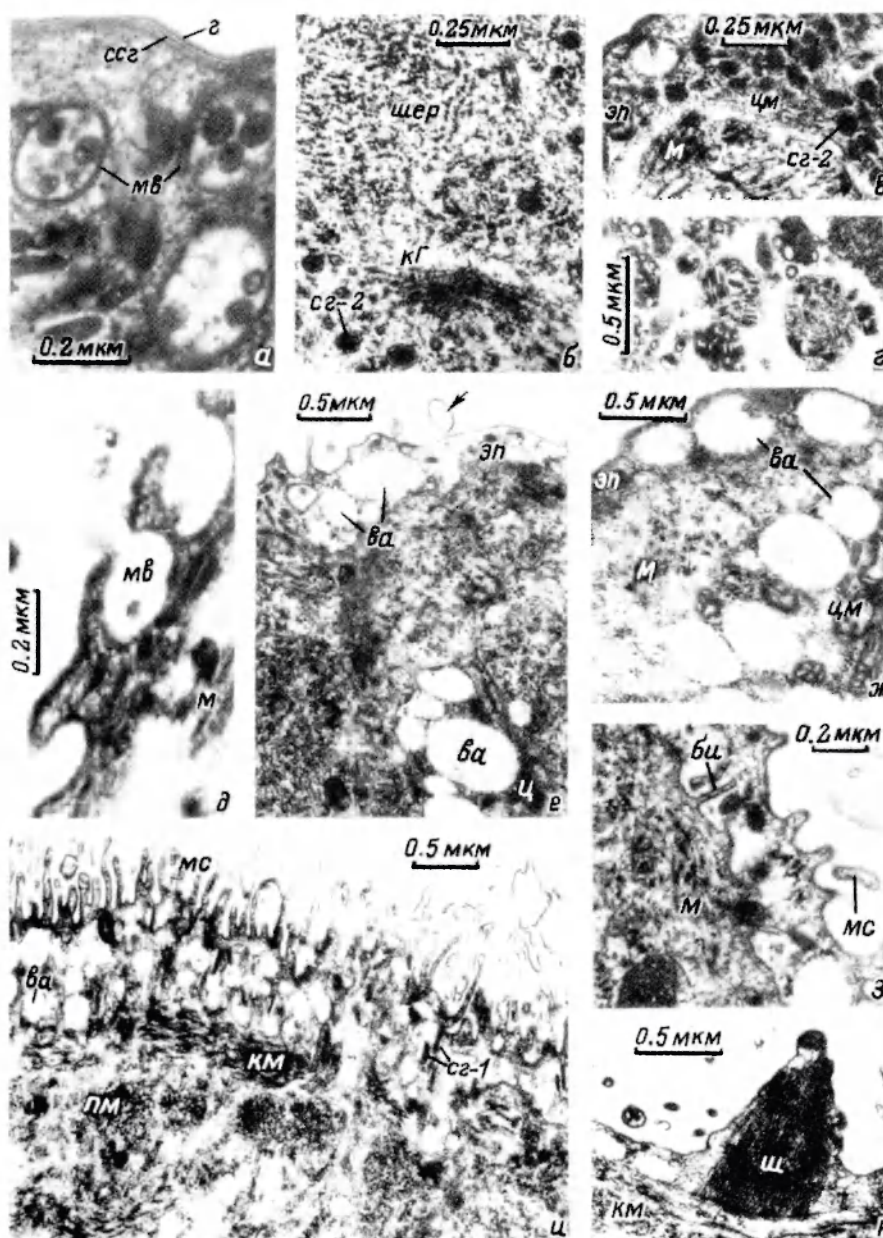


Рис. 3. Тегумент метацеркарий 5—12 дней развития *D. chromatophorum*.

*a* — тегумент МЦ 5-го д. р.; *б* — участок вновь дифференцированного цитона МЦ 5-го д. р.; *в* — цитоплазматический мостик; *г* — фрагментация цитоплазмы «церкарных» цитонов у МЦ 5-го д. р.; *д* — тегумент МЦ 6-го д. р.; *е* — тегумент МЦ 7-го д. р.; *ж*, *з* — тегумент МЦ 10-го д. р.; *и* — тегумент вентральной стороны тела МЦ 12-го дня развития; *к* — тегумент дорсальной стороны тела МЦ 12-го дня развития; *бу* — инвагинации базальной мембраны; *кГ* — комплекс Гольджи; *шер* — шероховатый ЭПР; стрелка — отпочковывание везикул.

Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

Fig. 3. Tegument of 5—12-day-old *D. chromatophorum* metacercariae.



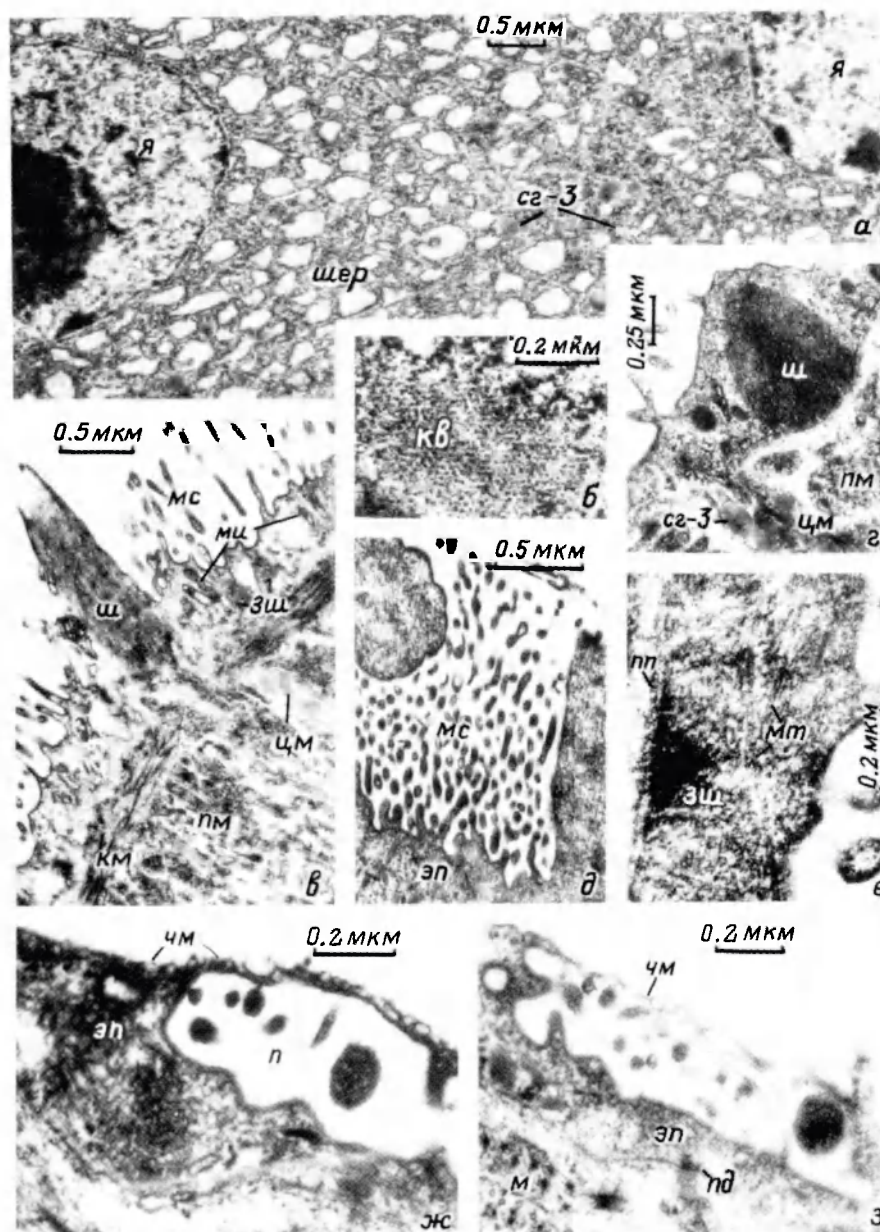


Рис. 4. Тегумент метацеркарий 12—20 дней развития *D. chromatophorum*.  
 а — многоядерные цитоны МЦ 12-го д. р.; б — включения кристаллоидного материала в цитонах МЦ 20-го д. р.; в—е — тегумент МЦ 20-го д. р.; ж, з — участки локальной реорганизации тегумента.

Обозначения те же, что на рис. 1—3.

Fig. 4. Tegument of 12—20-day-old *D. chromatophorum* metacercariae.

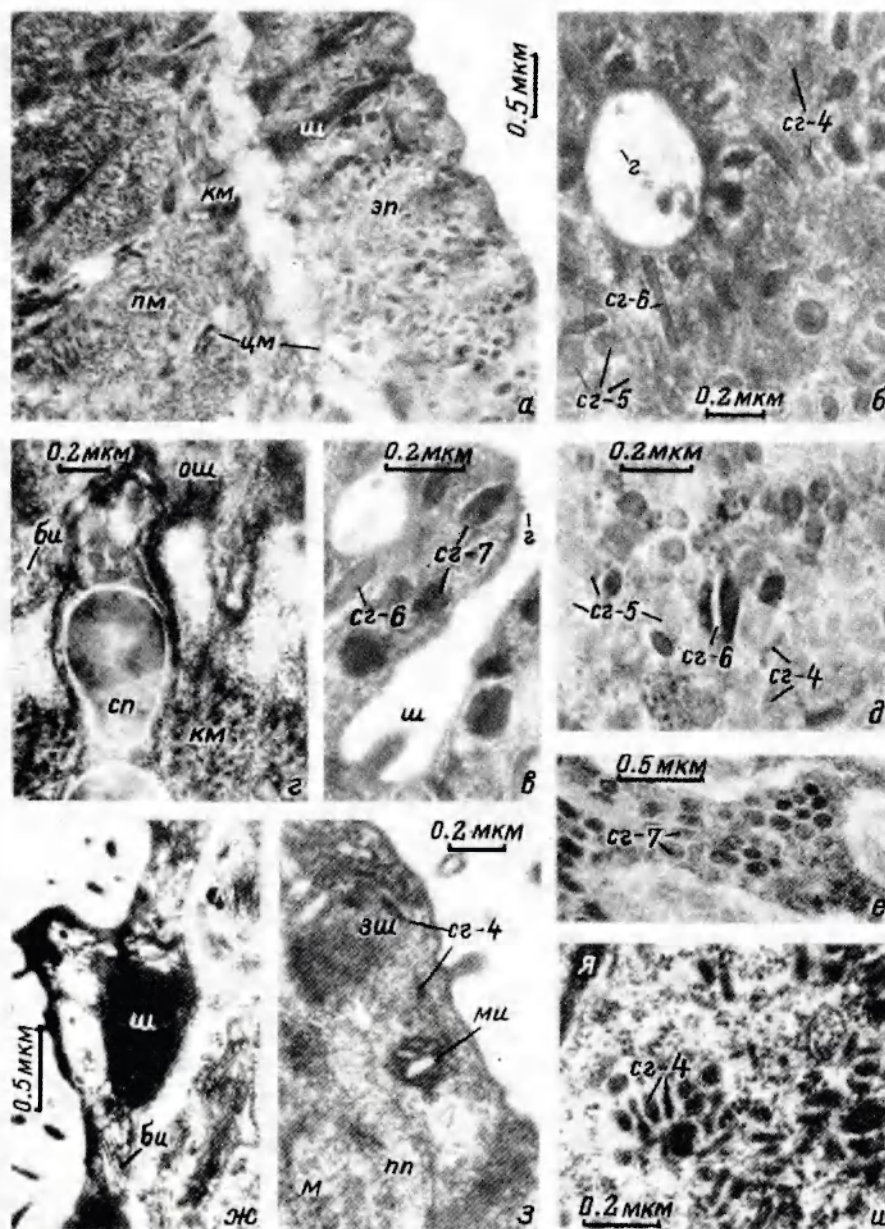


Рис. 5. Тегумент метацеркарий 34—49 дней развития *D. chromatophorum*.

а — стенка тела МЦ 49-го д. р.; б, в — фрагменты покровного эпителия МЦ 40-го д. р.; г — секреторный проток в стенке тела МЦ 40-го д. р.; д, е — участки цитонов МЦ 40-го д. р.; ж — дегенерирующие шипы МЦ 34-го д. р.; з — зачатки дефинитивных шипов в тегументе МЦ 34-го д. р.; и — участок цитона МЦ 34-го д. р.

Обозначения те же, что на рис. 1—4.

Fig. 5. Tegument of 34—49-day-old *D. chromatophorum* metacercariae.